

VIP 수용체 VPAC1과
S-SCAM의 상호 작용

연세대학교 대학원

의과학과

김 영 응

VIP 수용체 VPAC1과
S-SCAM의 상호 작용

지도 이 민 구 부교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

김 영 응

목차

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 재료 및 관류액	7
2. 세포 배양 및 transfection	7
3. Subcloning, 점 돌연변이화, anti-sense	8
4. Western blot	9
5. 면역침강	9
6. Biotin 표지 실험	10
7. cAMP 농도 측정	11
8. Short circuit current (Isc) 측정	11
9. 통계처리	12
III. 결과	13
1. 효모에서의 연결단백과 VPAC1 단백질과의 상호작용	13
2. 포유류 세포에서의 VPAC1 단백질과 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 상호작용	13
3. HEK293 세포주에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질 활성에 미치는 영향	15
4. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 세포막 발현에 미치는 영향	16
5. T84 세포주에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 활성에 미치는 영향	18
IV. 고찰	21
V. 결론	27
참고문헌	29
영문요약	38

표 차례

표 1. VPAC1 단백질과 PDZ 연결단백의 결합에 대한 yeast two-hybrid 실험	13
--	----

그림 차례

그림 1. HEK293 세포주에서 VPAC1 단백질과 S-SCAM 단백질의 상호 결합	14
그림 2. HEK293 세포주에서 VIP 농도에 따른 세포내 cAMP 농도 측정	15
그림 3. S-SCAM/MAGI-2 단백질에 의한 VPAC1 단백질의 세포막 발현양 변동	17
그림 4. S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현이 감소된 T84 세포주	18
그림 5. T84 세포주에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현 감소가 미치는 VPAC1 단백질의 활성 변화	19

감사의 글

“ 무딘 철 연장 날을 갈지 아니하면 힘이 더 드느니라 오직 지혜는 성공 하기에 유익하니라 .” < 전도서 10장 10절 >

이 논문을 쓰기 까지 부족한 저를 붙들어 주시고 힘과 능력을 주시며 이끌어 주신 하나님께 감사드립니다. 그리고 무딘 철 연장 날을 갈지 아니하면 힘이 더 든다고 하셨는데 제가 어렸을 때부터 지혜로 저를 잘 다듬어 주셨던 선생님들 고맙습니다. 저를 아들처럼 잘 대해주시며 학식에 있어서 어머니와 같이 지도해 주셨던 김윤희 교수님, 철없던 학부 시절, 생물학에 기초를 닦게 도와 주셨던 경희대 교수님들과 연세대 교수님들 고맙습니다. 그리고 석사과정 동안 지혜로 이끌어 주시며 지식을 선히 베풀어 주시며 여러모로 상의해주셨던 지도교수님이셨던 이민구 교수님 고맙습니다. 인자하게 저희를 이끌어 주셨던 김경환 교수님, 밝은 웃음으로 편하게 해주셨던 김혜영 교수님, 운동을 좋아하시는 멋진 안영수 교수님, 학생들에게 여러모로 관심을 가져주시는 김동구 교수님, 언제나 웃어주시며 좋은 말씀도 해주시던 장정원 교수님, 인상이 좋으신 박경수 교수님, 제가 졸업논문을 쓰는데 심사를 봐주시며 도움 주셨던 신전수 교수님, 모두 고맙습니다.

우리 실험실의 큰 형인 착하고 조용한 우인이형, 큰 누나이며 저의 사수였던 우리 주영누나, 똑똑하고 착하고 성실하고 효자인 완이형과 형수님이 되실 마음이 착한 신영누나, 착하고 예쁜 진아 누나, 언제나 우리에게 웃음을 주며 잘해주던 원선누나, 맘이 아이같이 여리고 맑은 지하누나, 웃음이 가득했던 성목형과 성찬형, 듬직하고 착했던 친구 형민이, 나랑 실험실에서 편한 친구로 있던 민재와 지현이, 우리 실험실 막내 지현이 모두 좋은 나

의 소중한 사람들이었습니다. 그리고 항상 저희를 신경써주시던 임주원 선생님, 이주영선생님, 이진우 형 그리고 lab 2 의 혜원선생님, 장원형, 지혜누나, 지훈형, 동휘, 혜연이, 순옥이, lab 3의 시호형, 남열이형, 재구형, 민수형, 재우형, 형진누나, 희정이, 미주, lab 4의 인숙누나, 현수형, 정호형, 용재 등 약리학 교실원 모두에게 진심으로 고맙습니다. 그리고 약리학교실을 관리해주시고 도와주신 임종수 선생님, 김건태 선생님 그리고 착하고 예쁜 선자 누나 고맙습니다.

나의 소중한 친구들, 멋진 호진, 오형, 효신, 준오, 재상, 선준, 병훈 모두 옆에 있으며 도와줘서 하나님께 감사드리고 모두 고맙다.

저를 위해 기도해주시고 진리로 교훈 해주신 이석호 목사님을 비롯하여 주님말씀의 교회 분들 고맙습니다.

그리고 마지막으로 나의 소중한 가족들, 항상 잘되라고 기도해주신 할아버지, 자상하시고 인자하신 내가 세상에서 제일 존경하는 천국에 계신 우리 아버지와 항상 저를 위해 기도해주시며 지혜로 권면해주시는 지혜롭고 예쁜 우리 어머니, 멋지신 미래의 장인 장모님, 나의 소중한 보석이자 나의 미래의 신부 예쁜 소정아, 나의 멋지고 착한 동생 성웅이, 예쁘고 착한 동생 지나, 미래의 처형이 될 예쁘신 수민씨, 미래의 처남이 될 멋진 준식이, 그리고 큰이모와 맘씨 좋은 중현이형, 중민이형, 중광이형, 미란누나를 비롯한 둘째 이모네, 셋째 이모네 모두 하나님께 감사드리고 고맙습니다. 모두 주님 안에서 존경하고 사랑합니다.

국문요약

VIP 수용체 VPAC1 과 S-SCAM의 상호 작용

Vasoactive intestinal peptide (VIP)는 대부분의 중추 신경계와 말초 신경계 모두에서 발견되고 있는 신경전달물질 또는 신경조절물질이다. VIP는 포유류 동물에서 소화기관, 심혈관계, 호흡기, 면역계, 내분비계, 중추신경계 등에서 다양한 생물학적 활성을 일으킨다. VIP 증양은 VIP를 다량으로 분비하여 혈액 내 VIP 농도를 비정상적으로 높여서 WDHA (watery diarrhea, hypokalemia, and achlorhydria ; 수용성 설사, 저칼륨혈증, 무산증) 증후군과 고칼슘혈증을 유발 시킨다.

본 논문에서는 VIP 수용체 중의 하나인 VPAC1 (vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor 1)의 조절을 연결단백들과 연결 지어 연구하였다. Yeast two-hybrid 방법을 통하여 흰쥐의 연결단백인 S-SCAM/MAGI-2의 PDZ 1 과 PDZ 2 분역 (domain)이 생쥐의 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단과 상호결합 하는 것을 밝혔다. S-SCAM/MAGI-2 는 6개의 PDZ 분역 (PDZ 0에서 PDZ 5), 1개의 GK (Guanylate kinase) 분역, 2개의 WW 분역을 가지고 있는 연결 단백질이다. HEK293 세포주에 두 단백질의 유전자를 transfection하여 S-SCAM/MAGI-2 단백질과 VPAC1 단백질이 상호 결합함을 면역침강 방법으로 재확인하였다. VIP의 자극에 대한 VPAC1의 주요 반응은 Gs 단백을 활성화시켜 세포내 cAMP 농도를 증가시키는 것이다. 흥미롭게도, S-SCAM/MAGI-2 단백을 안정적으로 발현 시킨 HEK293 세포주에서 VIP자극에 대한 VPAC1 단백질의 활성이 감소하여 세포내 cAMP 생성이 감소되었다. S-SCAM/MAGI-2 단백 발현을 anti-sense 방법으로 감소시킨 T84 세포

주에서 VIP 자극에 의한 cAMP 생성이 증가되어 CFTR 활성이 증가하였다. 이 사실은 S-SCAM/MAGI-2 연결단백이 VPAC1 단백질의 활성을 억제 조절한다는 것을 의미한다. 따라서 이 현상의 분자적 기전을 알기 위해서 surface biotinylation 실험을 수행하여 VPAC1 단백질의 세포막 발현양을 측정하였다. 그 결과 VPAC1 단백질의 세포막 발현이 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 존재할 때 감소함을 확인하였다.

본 실험 결과를 통해 S-SCAM/MAGI-2 연결 단백질은 VPAC1의 세포막 발현을 감소시켜 VPAC1의 활성을 억제함을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과는 VIP 관련 질환의 효과적인 치료법을 개발하는데 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말: VPAC1, S-SCAM/MAGI-2, PDZ, cAMP

VIP 수용체 VPAC1과 S-SCAM의 상호 작용

<지도 이민구 부교수>

연세대학교 대학원 의과학과

김 영 응

I. 서론

VIP (vasoactive intestinal peptide)는 1970년에 Said 와 Mutt에 의해 돼지의 십이지장에서 처음 분리되었다. VIP는 28개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 아미노산 배열은 PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)와 가장 유사하며 secretin, glucagon, gastric inhibitor polypeptide 등과 비슷하다.¹ 종간에서의 VIP의 아미노산 배열은 사람, 소, 양, 염소, 개, 토끼, 흰쥐 등에서는 같으며, 포유류 외 동물과 Guinea pig의 경우에는 사람의 VIP와 단지 4~5 개의 아미노산의 배열이 다를 뿐이다. 이렇게 잘 보존된 VIP는 중추신경과 말초신경에서 비아드레날린성, 비콜린성 신경전달물질과 신경조절물질의 역할을 한다. VIP는 혈관의 평활근을

이완시키고 장과 췌장의 소화액과 Na^+ , K^+ , Cl^- 등의 전해질 분비를 유도하는 역할을 한다.¹ 이외에도 뇌, 심장, 소화기관의 혈액의 흐름에 관여하며, 에너지대사에 관여하여 글리코젠이 포도당으로 분해되는 것을 촉진시킨다. 그리고 mucus 분비를 촉진시키며, 세포 성장을 촉진하여 암세포에서 성장인자로 사용되기도 한다. 또한 손상된 조직에서 항염증반응을 일으켜 염증 반응에 따른 조직의 손상을 억제하는 역할도 한다.¹⁻⁸

VIP는 장관에서 설사질환과 관련이 깊다. 설사의 원인은 장 상피세포가 비정상적으로 많은 양의 이온과 물을 체강으로 분비하기 때문이며, 이 때 과도한 물의 분비와 관련 있는 이온은 Cl^- 이온이다. Cl^- 이온의 분비는 상피세포 내강막에 존재하는 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 단백질에 의해서 조절된다. CFTR은 Cl^- 이온통로이며 ABC (ATP Binding Cassette) 수송 단백질의 하나로서, 세포내 cAMP 농도가 높아지면 활성화 되어 Cl^- 이온을 분비하는 역할을 한다.⁹⁻¹³ 장 상피 세포내의 비정상적인 cAMP 증가는 CFTR 단백질의 활성화를 가져와 많은 양의 Cl^- 이온을 체강으로 분비하며, 이는 물의 과도한 분비를 가져와 설사를 유발한다. VIP종양은 VIP를 다량으로 분비하여, 혈중 VIP 농도를 비정상적으로 높여 장세포의 VPAC (vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor) 단백질의 활성화를 가져온다. 이러한 VIP 수용체의 활성화는 세포내 cAMP 농도를 비정상적으로 증가하게 만든다. 따라서 장 세포내 증가된 cAMP는 CFTR 단백질을 활성화시켜 설사를 유발한다.¹⁴⁻¹⁸ 이와 같이 VIP는 장세포의 이온과 물 분비에 깊이 관련되어 있다.^{3,18}

VIP 수용체는 VPAC1과 VPAC2 두 가지가 있다.^{1,19} VIP 수용체 단백질은 G 단백질 연결 수용체로서 7개의 transmembrane domain을 가지고 있다. 분자량은 43,000~80,000 dalton으로 중간 차이가 있으며, 각 세포 특성에 따

라 당단백화 정도의 차이로 인하여 다양한 분자량을 나타낸다.^{1,3,8,20,21} VPAC1 단백질과 VPAC2 단백질은 50%의 동일성을 가지며 secretin 수용체 족의 특징을 공유하고 있다. VPAC1 단백질은 중추신경계에 널리 분포하고 있으며 간, 폐, 장, 심장, 지방세포, 대동맥, 조직 내 혈관 등에도 분포한다. VPAC2 단백질은 olfactory lobe, 시상, suprachiasmatic nucleus에 풍부하게 존재하며 해마, 뇌간, 척수, dorsal root ganglia에는 적게 존재한다. 그리고 심장, 췌장, 신장의 수질, 부신 피질, 골격근, 지방 세포에도 존재한다. VIP 수용체의 주요 신호전달기전은 Gs 단백을 활성화하여 adenylyl cyclase를 활성화시켜 세포내 cAMP 농도를 증가시키는 것이다. 이외에도 guanylate cyclase, cyclooxygenase를 활성화 시켜서 cGMP, 일산화질소(NO)를 생성하기도 하며, 세포내 칼슘농도를 떨어뜨려 혈관 평활근 막의 과분극을 유발하기도 한다.^{1,8,22,23}

S-SCAM (synaptic scaffolding molecule, MAGI-2)은 MAGUK (membrane associated guanylate kinase homologues) 연결단백의 일종이다.²⁴ MAGUK은 여러 단백질과 상호 작용할 수 있는 분역으로 WW, SH3, GK (Guanylate kinase) homology, PDZ 등을 가지고 있다. MAGUK은 여러 단백질이 multimolecular complex를 이루게 하는 연결단백이다. 특히, S-SCAM은 PDZ 분역 6개, GK 분역 1개 및 WW 분역 1개를 가지고 있어 여러 단백질 간의 상호작용에 관여하고 있다. 흰쥐의 S-SCAM 단백질은 사람에서 MAGI-2 단백질에 해당하며 높은 homology를 갖는 MAGI-1, MAGI-3 단백질도 존재한다.²⁵ PDZ 분역은 두개의 α helix와 6개의 β sheet 구조를 가지며, 그 중 두 번째 β sheet와 두 번째 α helix 구조가 만든 groove에서 다양한 단백질의 카르복실기 말단 부위가 상호 결합한다.^{26,27} 일부 단백질에서는 단백질의 중간 부위가 PDZ 분역과 상호작용하기도 한다. S-SCAM이 가지고 있는 PDZ 분역은 PDZ 0, PDZ 1, PDZ 2, PDZ 3,

PDZ 4, PDZ 5 등으로 각 PDZ 분역마다 여러 단백질이 상호 작용하고 있다.^{28,29} PDZ 4와 PDZ 5 분역을 통해 S-SCAM끼리 상호 결합하여 homodimer를 구성하기도 한다.²⁸ β_1 아드레날린성 수용체는 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 PDZ 1 분역과 상호 결합하여 결합물질 유도 internalization이 빨리 일어나게 된다. 반면 β_1 아드레날린성 수용체와 상호 결합하는 PSD-95 연결단백은 β_1 아드레날린성 수용체의 결합물질 유도 internalization을 느리게 한다.³⁰ 또한 S-SCAM/MAGI-2는 암 억제제인 PTEN 단백질과 상호 결합하여 PTEN 단백질의 작용을 강화하는 역할을 한다.³¹⁻³³

본 연구에서 VIP 수용체의 활성 조절에 관여하는 단백질을 찾기 위하여 yeast two-hybrid를 수행하였고, 그 결과 VPAC1 단백질과 S-SCAM/MAGI-2 연결단백이 상호 결합함을 찾아내었다. 다음으로 연결 단백질인 S-SCAM/MAGI-2가 VPAC1 단백질과 상호 결합함을 포유류 세포에서 확인하고, VPAC1 단백질 활성에 어떤 변화를 주는지 검색하였다. VPAC1 단백질 활성 조절 기전의 규명은 앞서 말한 설사 뿐만 아니라 VIP와 관련된 질병들을 이해하는 데도 도움을 줄 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 관류액

VIP는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였고 anti-c-myc 항체는 Santacruz biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Anti-S-SCAM 항체는 KAIST의 김은준 선생님께서로부터 받았다.³⁴ Trypsin을 비롯한 이외의 모든 시약은 Sigma (St, Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Ussing chamber에 흐르게 하는 HCO₃⁻ 관류액은 NaCl 120mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, D-Glucose 10mM, HEPES 5mM, NaHCO₃ 25mM 로 구성되며, pH는 7.4에 맞추었다.

2. 세포 배양 및 transfection

HEK293, T84 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 각각 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 DMEM과 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin를 첨가한 F12/DMEM 배양액을 넣고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양했다. 그리고 원하는 유전자를 transfection시켜 안정적으로 발현시킨 세포주들은 G418를 400 µg/ml 첨가하여 유지시켰다. 또한 Transwell-Clear Pol membrane (0.4mm pore diameter, Costar, USA)을 사용하여 T84 세포주를 10 일 이상 키우고 short circuit current를 측정하였다. Transfection은 LipofectAMINE Reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 하였다. Transfection한 후 48 시간이상 세포주를 37 °C, 5% CO₂ 에서 배양하고 실험에 사용하였다.

3. Subcloning, 점 돌연변이화, anti-sense

연구를 쉽게 사용하기 위해서 pBluescript KS+에 들어있는 생쥐의 VPAC1 유전자를 subcloning하여 아미노말단에 c-myc tag을 붙여 주었다. 이를 위해 pCMVmyc 벡터를 사용하였다. 다음 primer를 사용하여 DNA 중합반응에 사용하여 VPAC1 유전자를 벡터에 넣었다.

sense : 5' CC GGA ATT CGG (*EcoRI* 자르는 부분 첨가) ATG
CGC CCT CCG AGC CTA C 3'

antisense : (5' C CGG GGT ACC (*Kpn I* 자르는 부분 첨가) TCA
GAC CAG GGA GAC CTC C 3')

S-SCAM/MAGI-2 단백질과 결합할 것이라 예상되는 생쥐의 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단에서부터 4개 아미노산을 없앤, 점 돌연변이된 VPAC1을 만들었다. 이는 생쥐의 VPAC1 유전자에서 카르복실기 말단에서부터 5번째 아미노산인 glutamic acid를 coding하고 있는 GAG 코돈을 stop 코돈인 TAG로 바꾸어 시행하였다. 아래의 primer를 사용하여 점 돌연변이화하였다.

sense : 5' C TTC CAA GCG **TAG** GTC TCC CTG GTC TCA CCG
3'

antisense : 5' CGG TCA GAC CAG GGA GAC **CTA** CGC TTG GAA
G 3'

S-SCAM/MAGI-2를 내인적으로 발현하는 T84 cell에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현을 줄이고자 S-SCAM/MAGI-2의 anti-sense mRNA fragment를 발현하는 clone을 만들었다. 아래의 primer를 이용해서

흰 쥐의 S-SCAM/MAGI-2 유전자의 앞부분에서 365개 염기서열 만큼을 DNA 중합효소로 추출하였다. 그것을 pCDNA3.1 벡터에 원래 방향과는 반대로 넣어서 anti-sense mRNA fragment를 발현하는 clone을 만들었다.

sense : 5' CGG AAT TCC TAC TAC CAT GTC CAA AAG CTT G
3'

antisense : 5' CGG GAT CCC TTC TGA AAT CTT AAG TTG AGG
3'

4. Western blot

세포가 자라는 용기를 얼음 위에 두고 차가운 PBS로 1번 세척하고 세포 용해 용액 (pH 7.9 Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Na₂EDTA 5 mM, Triton X-100 1%, PMSF 0.2 mM, Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 20 µM, Na₃VO₄ 1 mM)을 첨가하고 scraper로 긁어서 표본을 모았다. 초음파분쇄로 세포를 부수고 4 °C, 13000 rpm, 10 분으로 원심 분리하여 상층액을 얻고 Bradford 방법으로 정량하였다. 동량동일부피로 sample buffer에 섞어서 SDS-PAGE (6%, 8%, 10% gel)를 실시하고 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane을 5% 탈지분유에 blocking하고 1차 항체를 4 °C에서 밤새 동안 또는 상온에 2시간 반응시키고 TBS-T (Tween 20 0.15% 포함)로 10분씩 3번 씻었다. Peroxidase가 붙은 2차 항체를 실온에서 40분 반응시키고 TBS-T로 10분씩 4번 씻어내고 ECL용액을 사용하여 발광, 감광, 현상하였다.

5. 면역침강

생쥐의 VPAC1과 흰쥐의 S-SCAM의 유전자를 HEK293 세포주에 transfection하고 48 시간동안 배양한 후 Western blot일 때와 같이 표본을

얻었다. 표본 단백 1 mg에 anti-c-myc 항체를 1 μ g 넣어서 생쥐의 VPAC1을 잡고 protein-G-agarose를 첨가해서 침강시켰다. 침강된 agarose 외의 남은 용액은 제거하고 용해 용액으로 4번 씻었다. 2배 sample buffer를 첨가하여 2분 동안 끓는 물에 둔 다음 6% SDS-PAGE를 시행하였다. Nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후 상온에서 1시간 동안 5%탈지분유로 blocking하였다. 1차 항체인 anti-S-SCAM 항체로 4 °C로 밤새 동안 배양하고 TBS-T로 3번 10분 간격으로 씻었다. 2차 항체로 anti-rabbit conjugated peroxidase 항체를 사용하여 40분 동안 상온에서 처리하였다. TBS-T로 세척을 10분 간격으로 4번 하고 ECL용액을 사용하여 발광, 감광, 현상하였다.

6. Biotin 표지 실험

세포를 transfection하고 48 시간 이후 80 - 100% confluency로 되었을 때 배지를 흡입하여 제거하고 차가운 PBS로 4번 씻어 주었다. PBS에 Sulfo-NHS-SS-Biotin (PIERCE, IL, USA)을 1 mg/ml 농도로 3 ml를 세포에 처리하고, 세포가 든 용기를 얼음 위에 두고 4 °C 냉장실에서 30분간 아주 천천히 흔들어 주면서 배양하였다. 흡입하여 용액을 제거하고 10% FBS 1%, penicillin/streptomycin 이 첨가된 배지로 2번 씻어 주어서 남아 있는 biotin을 quenching하였다. 차가운 PBS로 한 번 씻어 주고 세포 용해 용액을 넣고 초음파분쇄로 10초 씩 4번 분쇄하고, 4 °C, 10 분, 13000 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액만 거두어 Bradford 방법으로 단백정량을 하였다. 단백 600 μ g에 50% Immobilized NeutrAvidin slurry (PIERCE)를 50 μ l 넣고 4 °C에서 밤새동안 잘 섞어 주었다. 세포 용해용액으로 5번 씻어 내고 2배 sample buffer를 넣고 50 °C로 1시간 처리하고 anti-c-myc 항체를 1차 항체로 하여 Western blotting을 하였다.

7. cAMP 농도 측정

6 well 용기에 세포를 깔고, Transfection 하여 VPAC1 단백질만 발현되는 세포와 VPAC1과 S-SCAM 두 단백질이 모두 발현되는 세포를 준비한 후 48 well 용기에 well 당 6×10^4 개 세포들을 넣었다. 5% CO₂, 37 °C에서 24시간 배양한 후 세포가 든 용기를 얼음 위에 두고 VIP를 농도별로 처리하였다. 2분 동안 5% CO₂, 37 °C 배양기 안에서 cAMP를 생성시켰다. 그 후 세포내 cAMP 농도를 재는 kit인 BT-300 (Biomedical Technologies Inc, Stoughton, MA, USA)을 이용하여 cAMP 농도를 측정하였다. 간단하게 과정을 보면, 표본 용액 중 20 μ l를 working buffer 용액에 12.5 배 희석하고 50 μ l를 glass tube에 옮긴다. 순서대로 acetylation complex를 2.5 μ l첨가하고 tracer를 50 μ l를 첨가한다. 그리고 antibody를 50 μ l를 첨가 한 후 30 초 정도 부드럽게 섞어준다. 4 °C 에서 18 - 20 시간 반응시키고 working buffer 용액을 500 μ l 첨가한다. 잘 섞어 준 후 4 °C, 3000 rpm, 35 분 원심 분리한다. 단, 원심 분리 할 때 고정축에 고정되지 않는 rotor를 사용한다. 상층액을 흡입 제거하고 Gamma spectrometer로 동위원소량을 측정하여 cAMP 농도를 구한다.

8. Short circuit current (Isc) 측정

Mock 벡터를 transfection한 T84 세포주와 anti-sense S-SCAM/MAGI-2를 transfection한 T84 세포주를 투과성 막에 10 일 정도 배양해 극성을 갖는 세포로 분화시켰다. 그 후 이를 Ussing chamber에 넣고 HCO₃⁻ regular buffer를 순환시키면서 실험하였다. 세포막 전위가 안정화된 후 1% BSA에 녹인 VIP 1 nM 를 측저막에 넣었다. 반응이 정점에 도달한 후 HCO₃⁻ regular buffer로 내강막과 측저막을 3번 씻었다. 다시 세

포막이 안정화 된 후 VIP 10 nM 를 내강막에 넣었다. 반응이 정점에 도달하면 다시 HCO_3^- regular buffer로 내강막과 측저막을 3번 씻어주고 세포막이 안정화 된 후 VIP 100 nM 를 내강막에 넣었다. 그리고 반응이 정점에 도달 하였을 때 bumetanide 100 μM 을 측저막에 넣었다. Ussing Chamber를 이용한 Isc 변동은 EVC 4000 precision V/I clamp (Sarasota, FL, USA)를 이용하여 측정하였다.

9. 통계처리

Isc와 저항 측정값은 평균 \pm 표준오차로 표현하였다. Mock 벡터를 transfection한 T84 세포주와 anti-sense S-SCAM/MAGI-2를 transfection한 T84 세포주에서 VIP 자극에 대한 Isc 변동 차이가 통계적으로 유의성이 있는지를 unpaired *t*-test를 이용해 평가하였다. 이 때 StatView 프로그램을 사용하였으며, $P < 0.05$ 일때 유의성이 있다고 하였다.

III. 결과

1. 효모에서의 연결단백과 VPAC1 단백질과의 상호작용

생쥐의 VPAC1 유전자에서 카르복실기 말단 30개 아미노산 부위를 중합 반응으로 부분 적출하여 bait 벡터인 pBHA 벡터에 *Bam*HI 과 *Hind*III 제한 효소로 삽입하였다. 이후 yeast two-hybrid 방법을 통하여 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단과 여러 연결단백의 PDZ 부위를 표현하는 prey 벡터인 pGAD10 과 상호 작용시켜 표 1의 결과를 얻었다. 흰쥐의 S-SCAM 단백질의 PDZ 1과 PDZ 2 분역과 VPAC1의 카르복실기 말단이 상호 결합함을 찾게 되었다 (표 1).

표 1. VPAC1 단백질과 PDZ 연결단백의 결합에 대한 yeast two-hybrid 실험

	pGAD10 alone	SAP97 PDZ1-2	PSD-95 PDZ1-3	S-SCAM PDZ1-2	Shank2 PDZ
VPAC 1	0%	1%	11%	56%	0%

Bait vector (pBHA)에는 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단을 prey vector (pGAD10)에는 연결단백의 PDZ 분역을 넣은 다음, 효모의 전체 colony 중에서 두 단백질의 결합이 발생한 blue colony의 숫자를 %로 표시하였다.

2. 포유류 세포에서 VPAC1 단백질과 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 상호 작용

포유류 세포에서 VPAC1 단백질과 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 결합하는지 알아보았다. HEK293 세포주에 흰쥐의 S-SCAM과 생쥐의 VPAC1 유전자를 transfection하고 면역침강 실험을 시행하였다. 아미노기 말단에 c-myc

tag을 단 VPAC1 단백을 anti-c-myc 항체로 침강시키고 침전된 단백질을 6% SDS-PAGE에 전기영동 하였다. Anti-S-SCAM 항체를 이용하여 blot 하여 S-SCAM 단백질의 유무를 살펴보았다. 그 결과 VPAC1 단백질과 S-SCAM/MAGI-2 단백질 모두 발현된 세포주 표본에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 면역침강 됐음을 확인했다 (그림 1). 이로서 HEK293 세포주에서 VPAC1과 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 상호 결합함을 알 수 있었다. 또한 VPAC1 유전자의 카르복실기 말단으로부터 5번째 아미노산 코돈을 stop 코돈으로 점 돌연변이화 한 후 면역침강을 수행한 결과, S-SCAM/MAGI-2 단백질에 대한 결합력이 뚜렷이 떨어짐을 관찰 하였다 (그림 1). 이를 통해 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단의 VSLV 부위가 S-SCAM/MAGI-2 단백질에 상호 결합하는데 중요함을 알 수 있었다.

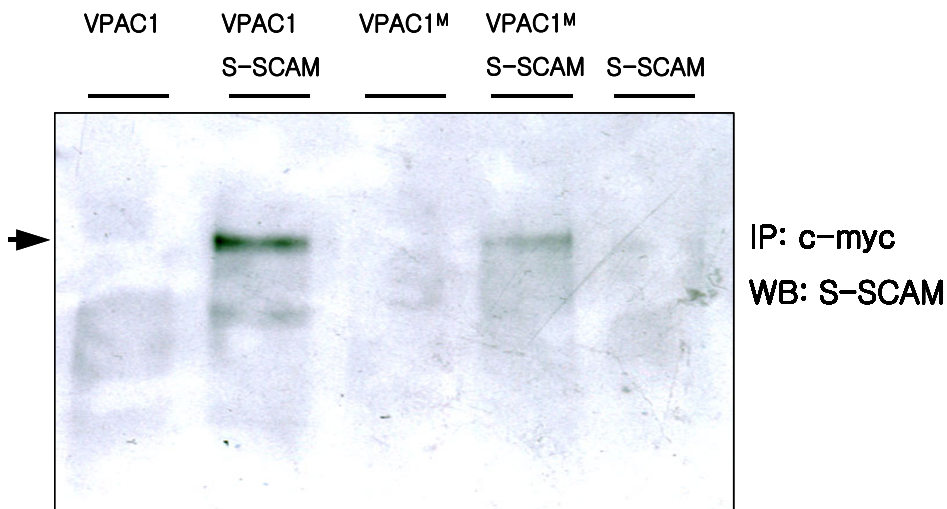


그림 1. HEK293 세포주에서 VPAC1 단백질과 S-SCAM 단백질의 상호 결합 생쥐의 VPAC1과 흰쥐의 S-SCAM 유전자를 co-transfection한 표본에서 S-SCAM band가 진하게 나타남을 볼 수 있었다. 이를 통해 포유류 세포에서 두

단백이 상호 결합함을 알 수 있었다. VPAC1^M은 VPAC1의 카르복실기 말단에서 부터 5개 아미노산 부위를 결손시킨 단백질이다. VPAC1^M과 S-SCAM을 co-transfection한 표본에서 두 단백질 간의 상호 결합이 거의 사라졌다. 즉, VPAC1 단백질의 카르복실기 말단 부분의 VSLV 구조가 S-SCAM 단백질의 PDZ 1과 PDZ 2 분역과 상호 결합하는 데 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

3. HEK293 세포주에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질 활성화에 미치는 영향

S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질에 결합함에 따른 VPAC1의 활성 변화를 알아보았다. VPAC1의 주요 2차전달자인 cAMP 농도를 측정하여 VPAC1의 활성변화를 측정하였다.

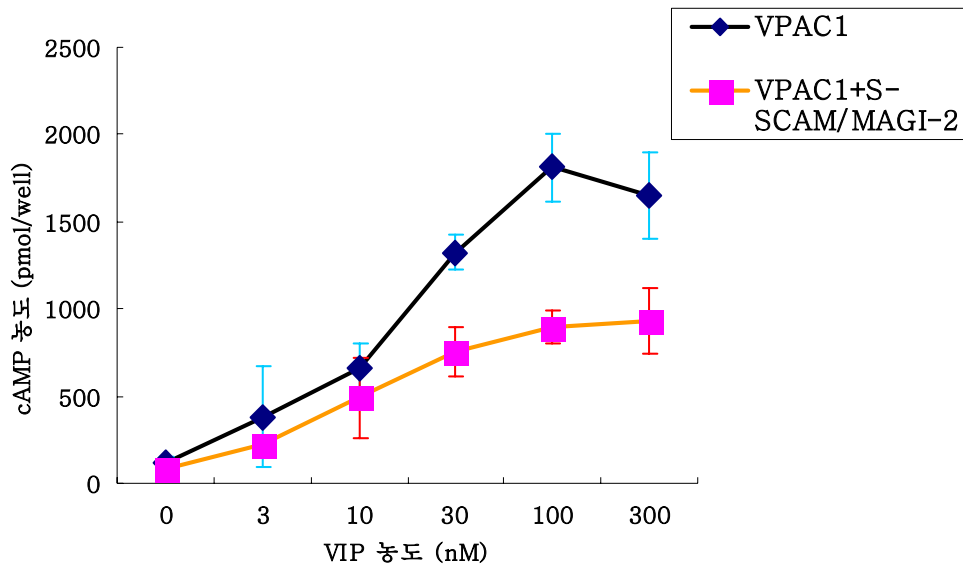


그림 2. HEK293 세포주에서 VIP 농도에 따른 세포내 cAMP농도 측정.

S-SCAM/MAGI-2 단백질이 안정적으로 발현하고 있는 HEK293 세포주에서 VPAC1 단백질의 활성이 억제됨을 세포내 cAMP 농도 생성량 차이를 통해 알 수 있었다.

우선 S-SCAM/MAGI-2 유전자를 transfection하여 안정적으로 S-SCAM/MAGI-2 단백을 발현하는 HEK293 세포주와 mock 벡터를 transfection한 HEK293 세포주를 만들었다. 그리고 이 두 세포주에 생쥐의 VPAC1 유전자를 transfection하고, VIP를 농도별로 처리하여 cAMP가 증가하는 양상을 관찰하였다. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질과 결합하고 있을 때 VIP의 자극에 대한 cAMP의 생성량이 감소함을 알 수 있다 (그림 2).

4. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 세포막 발현에 미치는 영향

S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현으로 인한 VPAC1의 활성변화 원인을 알고자 하였다. 그래서 세포의 VIP 자극에 대한 반응차이가 VPAC1 단백질의 세포막 발현양의 변화에 의해서인지 알기위해 surface biotinylation 실험을 수행하였다. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 안정적으로 발현하는 HEK293 세포주와 mock 벡터를 넣은 HEK293 세포주에 생쥐의 VPAC1 유전자를 transfection하였다. 48 시간 이후 세포막표면의 단백들을 표지하는 biotin을 처리하고 biotin이 붙은 막 단백만을 avidin bead를 이용하여 분리하였다. 이 단백들을 10% SDS-PAGE에 전기영동하고 anti-c-myc 항체를 이용하여 blot하여 세포막에 발현되었던 VPAC1만을 측정하였다. 그 결과 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 안정적으로 발현되는 HEK293 세포주에서 VPAC1 단백질의 세포막 발현이 감소함을 알 수 있었다 (그림 3).

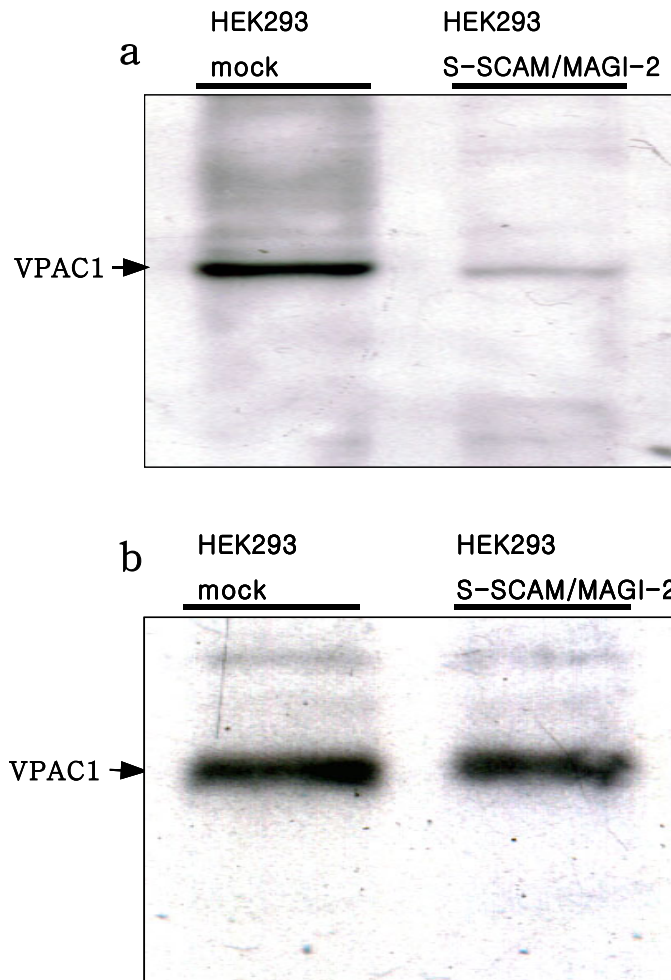


그림 3. S-SCAM/MAGI-2 단백질에 의한 VPAC1 단백질의 세포막 발현양 변동

a. VPAC1 단백질의 세포막 발현양을 비교한 실험이다. Biotin을 세포막 표면 단백질에 붙이고 avidin으로 이를 침강시켜 SDS-PAGE에 전기영동한 후 anti-c-myc 항체로 blot을 수행하였다. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 세포막 발현을 감소시켰다. **b.** Anti-c-myc 항체로 표본의 lysate를 blot 하였다. VPAC1 단백질이 두 세포주에서 비슷한 양으로 존재한다.

5. T84 세포주에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 활성화에 미치는 영향

T84 세포주는 내인적으로 사람의 VPAC1 단백질이 발현되고 있다.³⁵ Western blot을 통해서 사람에서 흰쥐의 S-SCAM의 아형인 MAGI-2 단백질이 발현됨을 확인하였다. 그리고 T84 세포주에 많이 발현되는 CFTR은 세포내 cAMP 증가에 따라 활성화 되는 대표적인 Cl^- 이온 통로이다.³⁶ 따라서 T84 세포주에서 VIP 자극에 의한 CFTR의 활성변화를 측정하여 VPAC1의 활성변화를 측정할 수 있다. T84 세포주에 S-SCAM/MAGI-2 유전자의 anti-sense mRNA fragment를 안정적으로 발현시켜 S-SCAM 단백질의 아형의 발현을 감소 시켰다 (그림 4). 이 세포주와 mock 벡터를 transfection 하여 키운 T84 세포주를 각각 투과성 막에 tight junction을 이루어 극성을 가지며 분화하도록 10 일 이상 배양했다. 이는 실제 생체

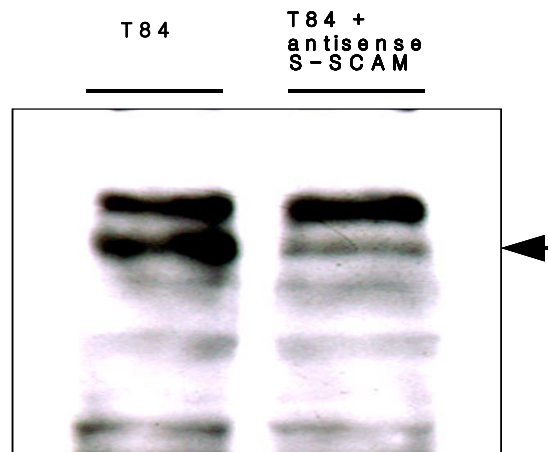
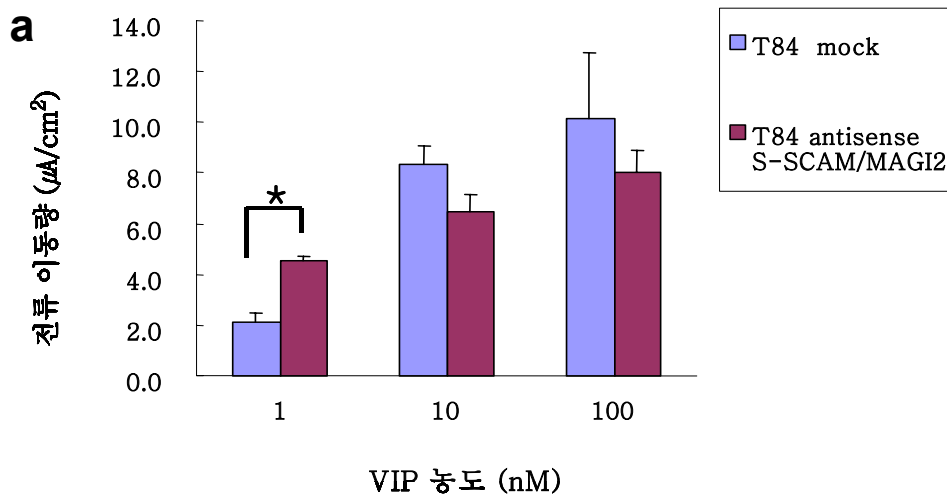


그림 4. S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현이 감소된 T84 세포주

T84 세포주에 발현하고 있는 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현이 anti-sense 방법으로 감소됨을 보여주고 있다.

내의 장 세포에 가깝게 세포 분화를 유도한 것이다. 투과성 막에 배양한 단일세포막을 Ussing chamber에 넣고 관류액을 내강막과 측저막으로 나누어 관류하며 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화를 측정하였다. S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현이 감소된 T84 세포주에서 VIP 1nM를 측저막에 처리하였을 때 mock 벡터를 transfection한 T84 세포주에 비해 215% 큰 전류 변동을 형성하였다 (그림 5). T84 세포주에서도 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1의 활성을 억제하고 있음을 알 수 있었다. 또한 S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현이 감소된 T84 세포주에서 mock 벡터를 transfection한 T84 세포주에 비해 저항값이 30% 낮게 측정되었다.

Bumetanide 100 μM 은 VIP 처리에 따른 전류의 변화가 CFTR에 의한 것임을 증명하기 위해 처리한 것이다. Bumetanide는 측저막에 발현하는 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter의 기능을 억제하여, Cl^- 이온의 세포내 흡수를 막는다. 그 결과 세포내 Cl^- 이온의 농도가 낮아지게 되고 CFTR을 통한 Cl^- 이온의 이동이 억제된다.



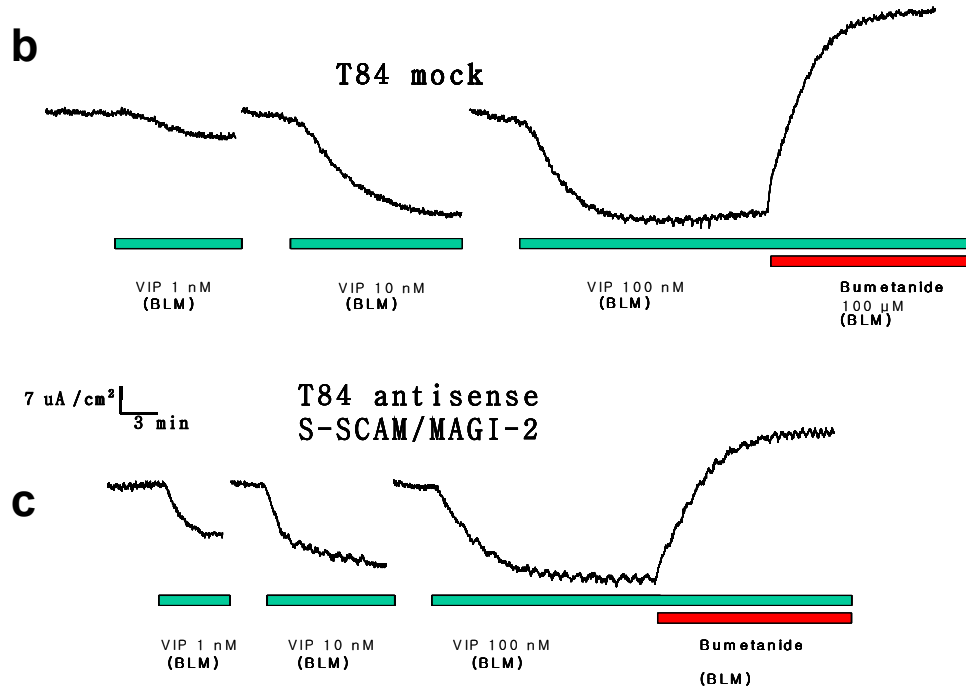


그림 5. T84 세포주에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현 감소가 미치는 VPAC1 단백질 활성 변화

a. VIP 농도에 따른 전류 변동을 측정된 값이다. S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현이 감소한 T84 세포주에서 VIP 1 nM을 처리하였을 때 mock 백터를 넣은 T84 세포주에 비해 전류생성이 215% 증가하였다 (*는 $P < 0.05$ 를 의미함). b. Mock 백터를 넣은 T84 세포주에서 VIP 농도에 따른 전류의 변동을 나타낸 그래프이다. c. S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현이 감소된 T84 세포주에서 VIP 농도에 따른 전류의 변동을 나타낸 그래프이다 (BLM: 측정막).

IV. 고찰

장과 기관지에서 물의 이동과 이온의 이동은 밀접한 관련을 맺고 있다. 물의 이동과 관련하여 중점적인 역할을 하는 이온으로 Cl^- 이온이 있고 Cl^- 이온의 이동을 중추적으로 조절하는 수송 단백질은 CFTR이다. 그리고 CFTR은 ABC 단백질의 일종으로 세포내 cAMP 농도가 높아지면 그 활성이 높아지게 된다.¹³ VIP 수용체가 VIP에 의해 활성화 되는 것은 장이나 기관지의 상피세포내의 cAMP 농도가 증가하는 주요 기전 중 하나이다. 그러므로 상피세포에서 VIP 수용체의 활성조절은 CFTR의 활성조절과 밀접하게 연결되어 있고, 이는 이온과 물의 이동에도 중요한 영향을 미치고 있다. VIP 수용체의 아형인 VPAC1이 상피세포내 존재하는 연결 단백질들과 연결되어 조절되고 있을 것이라 가정하고 본 연구를 수행하였다. 먼저 VPAC1과 연결단백과의 상호 결합성을 yeast two-hybrid 방법을 사용하여 밝혔다. 특히 연결단백과 다른 여러 단백질 간의 결합하는 부위로 PDZ 분역에 관심을 가지고 살펴보았다. 연결단백 중 PDZ 분역을 6개, WW 분역을 2개, GK 분역을 1개 가지고 있는 S-SCAM/MAGI-2가 VPAC1 단백질과 상호 결합함을 알게 되었다. 이는 VIP 수용체에 관련한 이전의 보고에서, VIP 수용체의 카르복실기 말단의 구조상 PDZ 분역을 가지고 있는 단백질과 상호 결합할 것이라 예상한 것과 일치하는 것이다.¹

본 연구에서 효모에서만 아니라 포유류 세포에서도 VPAC1 단백질과 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 상호 결합 한다는 것을 밝혔다 (그림 1). 그리고 결합물질인 VIP 자극에 대한 VPAC1의 활성이 S-SCAM/MAGI-2 단백질과 상호 결합함으로써 어떻게 변하는지 알아보았다. 세포에서 VPAC1의 주요 이차 전달자인 cAMP의 농도측정 실험을 하였고, S-SCAM/MAGI-2 단백질이 안정적으로 발현하는 HEK293 세포주에서 VPAC1 단백질

의 활성이 감소됨을 확인되었다 (그림 2). 연결단백은 결합하는 단백질의 안정성과 이동에 관련하며, 다른 신호 전달 단백질과의 연결을 도와주거나 방해하여 단백질의 활성과 성질을 다양하게 조절한다.³⁷⁻³⁹ 그러므로 연결 단백질의 다양한 역할로 인해 VPAC1의 활성이 변화될 수 있는 것이다. 그 예로 S-SCAM/MAGI-2 단백질과 상호 결합하는 단백질들은 다양한 방식으로 그 성질과 활성이 조절되고 있다. S-SCAM/MAGI-2의 PDZ 1 분역은 암 억제 역할을 하는 PTEN 단백질의 카르복실기 말단과 결합한다. PTEN의 카르복실기 말단을 결손시켜 S-SCAM/MAGI-2 단백질과의 결합을 막으면 PTEN 단백질의 안정성이 감소하였다.³¹⁻³³ S-SCAM/MAGI-2 단백질이 상호 결합하는 단백질의 안정성에 영향을 미치고 있는 것이다. 또한 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 PDZ 5 분역에 NMDA 수용체는 상호 결합한다. NMDA 수용체가 clustering 형성하는데 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 homodimer와 PSD-95/SAP90과 SAPAP 같은 연결 단백질들의 역할은 중요하다. 또한 S-SCAM/MAGI-2 단백질은 자체적으로 PDZ 4와 PDZ 5 분역을 통해 homodimer를 이룬다. 한편, $\beta 1$ 아드레날린성 수용체는 S-SCAM/MAGI-2 단백질과 결합하였을 때, 결합물질 유도 internalization이 증가하였다. 그러나 $\beta 1$ 아드레날린성 수용체의 활성변화에는 영향을 주지 않았다.³⁰

S-SCAM/MAGI-2 단백질에 의해 VPAC1의 활성이 어떻게 변화되었는지 원인을 밝히기 위해 surface biotinylation 실험을 하였다. 세포막에 발현하는 VPAC1만을 biotin으로 표지하고 avidin과의 결합을 이용해서 따로 추출한 후 그 발현 양을 비교하는 실험이다. 그 결과 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 발현하는 HEK293에서 VPAC1 단백질의 세포막 발현양이 감소하였다 (그림 3). S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 세포막 발현을 막고 있었다. 이는, S-SCAM/MAGI-2 단백질이 PTEN 단백질에서처럼 VPAC1 단백질의 안정성에 영향을 주었을 가능성이 있다. VPAC1 단백질의 안정성과 관련하여 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 발현하고 있는 HEK293 세포주와 mock

백터를 넣은 HEK293 세포주의 lysate에서 VPAC1의 양은 비슷하거나 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 발현시 미량 감소하였다.

Surface biotinylation 실험을 통하여 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 세포막 발현을 억제하여 세포가 VIP 자극에 약하게 반응하게 됨을 알 수 있었다. 그러나 VPAC1 단백질의 세포막 발현 변화 외에 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 활성을 변화시키는 기전이 더 있을 수 있다.⁴⁰⁻⁴³ VPAC1 단백질은 class II G 단백질 연결 수용체로서 세포 밖에 나와 있는 아미노기 말단 부위는 매우 큰 반면 카르복실기 말단은 짧은 구조를 가진다.¹ 그러므로 VPAC1의 카르복실기 말단에 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 결합할 경우 VIP의 결합으로 인한 VPAC1 단백질의 구조 변화를 억제하여 G 단백질의 활성을 억제할 수 있다. 또는 G 단백질이 VPAC1 단백질의 세포내 부분에 결합하는 것을 막아 VPAC1의 활성을 억제 할 수 있다. 특히 S-SCAM/MAGI-2 단백질은 homodimer를 구성할 수 있고 여러 다른 연결 단백질과 상호작용을 많이 하고 있으므로, 이 큰 구조물이 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단에 붙는 것만으로도 VPAC1 단백질의 활성변화에 영향을 줄 수 있다. S-SCAM/MAGI-2 단백질은 VPAC1 단백질과 결합하는 PDZ 1과 PDZ 2 분역 외에도 다른 PDZ, GK, WW 분역들이 존재하여 다른 단백질들이 이 부위에 결합하여 VPAC1의 신호전달체계를 방해할 수 있다. 그리고 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1에 결합함으로써 VPAC1의 결합물질 유도 internalization의 변화를 가져올 수 있다. 또한 VPAC1의 조절기전인 PKA (protein kinase A)와 GRK (G protein-coupled receptor kinase)에 의한 인산화에 영향을 미칠 수 있다.^{1,44} 이는 앞으로 더 연구해 봐야 할 것이다.

VPAC1 단백질의 활성이 이온의 이동과 관련된 의미를 알기 위해서 Ussing chamber를 이용한 전류측정 실험을 하였다. S-SCAM/MAGI-2 단백질의 결합으로 인한 VPAC1 단백질의 활성 변화가 CFTR의 활성에 미치는 영향을 살펴보았다. 생체내 장 상피 세포들처럼 tight junction을 이루며 극

성을 가지도록 대장 기원 세포주인 T84를 투과성 막에 배양한 후 전류 측정실험을 하였다. T84 세포주에는 내인적으로 사람의 VPAC1을 발현하고 있다. 그리고 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 발현하는 것을 anti-S-SCAM 항체를 이용한 Western blotting으로 알아내었다. 또한 T84 세포주는 대장 기원 상피 세포이기 때문에 S-SCAM/MAGI-2의 아형인 MAGI-1과 MAGI-3가 발현하고 있을 수 있다. 그래서 흰쥐의 S-SCAM/MAGI-2 유전자로부터 아미노기 말단에서부터 365개 염기서열 만큼을 DNA 중합반응으로 추출하였다. 그리고 pCDNA3.1 벡터에 sense 방향과 반대로 넣어 anti-sense S-SCAM/MAGI-2 mRNA 조각을 만들어내는 anti-sense S-SCAM/MAGI-2 벡터를 만들었다. T84 세포에 anti-sense S-SCAM/MAGI-2 벡터를 transfection하여 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현을 안정적으로 감소시킨 세포주를 만들었다. S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현이 안정적으로 감소된 T84 세포주와 mock 벡터를 넣은 T84 세포주를 투과성 막에 10일 이상 키워서 극성을 가지도록 하였다. Ussing chamber를 이용하여 분화 시킨 세포주가 VIP 농도에 따라 전류 변동을 어떻게 하는지 측정하였다. 이 전류 변동은 CFTR의 활성화에 의해 형성되는 것이다. 전류 변동 측정을 통해 CFTR의 활성화 정도를 알아내었고, 이를 통해 VPAC1 단백질의 활성화 변화를 상대적으로 알 수 있었다. 실험 결과 VIP 1 nM를 처리하였을 때 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현이 감소된 T84 세포주에서 mock 벡터를 넣은 T84 세포주에 비해 215% 큰 전류가 이동하였다 (그림 5). 즉, T84 세포주에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현이 감소하였을 때 VPAC1 단백질의 활성화가 증가하였다. 이는 S-SCAM/MAGI-2 단백질을 안정적으로 발현 시킨 HEK293 세포주에서 VPAC1 단백질의 활성화가 감소한 결과와 일맥상통한다. 이 VPAC1 단백질의 활성화가 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 상호 결합으로 억제됨을 재확인 할 수 있었다. 그러나 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현이 감소되었을 때 VIP 농도증가에 따른 CFTR 활성화의 증가는

감소하였다. 이는 VIP 1 nM에서부터 VPAC1 단백질의 활성이 크기 때문에 고농도의 VIP에 대한 반응이 더 큰 차로 나타나지 않기 때문이다. 또한 VIP 10 nM, 100 nM를 처리했을 때 mock 백터를 넣은 T84 세포주가 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현을 감소시킨 T84 세포주에 비해 큰 전류 이동을 형성 하였다 (그림 5). 이는 단일 세포막이 VIP 1 nM에 노출 된 후 다시 측정된 것이기 때문에 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 다른 작용에 의해서 VIP 자극이 활성화 된 것일 수 있다. 또는 두 세포주 간의 세포 단일 막 저항이 다르기 때문에 저항 값이 낮은 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현이 감소된 T84 세포주에서 전류의 변화가 작게 나올 수 있다. Ussing chamber에서 세포 단일막의 저항을 측정하였을 때, mock 백터를 넣은 T84 세포주에서는 $1023 \pm 197 \Omega$ 비해 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 발현이 감소한 T84 세포주에서는 $717 \pm 51 \Omega$ 으로 30% 정도 낮은 저항 값이 측정 되었다. 저항 값이 낮은 경우 tight junction이 약하게 이루어진 것이므로 CFTR에 활성화로 인해 생성된 전류의 변화량이 작게 나타날 수 있다. 이는 MAGI 단백질이 세포의 tight junction과 성장에 깊은 관련을 가질 것이라는 결과들에 일치하는 것이었다.^{33,45,46} 또는, VIP 1 nM에서부터 S-SCAM /MAGI-2 단백질의 발현이 감소된 T84 세포주에서 CFTR의 활성이 최대에 가깝게 일어나서 고농도의 VIP 자극에서 대해서 반응이 크게 나타나지 못했을 수도 있다.

그러나 주목해야 할 것은 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 발현될 때 T84 세포주에서 저농도의 VIP 자극에선 반응이 작지만 VIP 10 nM, VIP 100 nM에서는 더 큰 차로 반응이 활성화 된다는 것이다. 이는 생체 내처럼 수시로 VIP가 분비되는 상황에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질이 발현함으로써 VPAC1의 활성이 VIP의 농도에 따라 잘 조절되는 것을 보여준다. VIP는 앞서 언급했듯이 다양한 조직과 세포에서 다양한 역할을 수행하는 신경전달물질이며 신경조절물질이다. VIP의 농도에 따라 반응이 큰 차로 나타나는 것은

조직과 세포들이 민감하게 역할을 수행하는데 중요한 요소이다. 실험결과를 종합하여 볼 때 S-SCAM/MAGI-2 단백질은 VPAC1 단백질의 활성을 억제하는 동시에 조절함으로서 조직과 세포들이 VIP의 농도에 따라 민감한 반응을 할 수 있게 도와준다.

VIP 수용체의 활성화는 VIP 종양에서 설사를 일으키는 중요한 기전이다. 본 실험에서 VIP 수용체 활성화의 조절 기전으로 연결단백인 S-SCAM/MAGI-2 단백질에 의한 VPAC1의 활성 조절을 보았다. 이는 매우 복잡한 세포내 신호 조절의 일부를 보았을 뿐이다. 상피 세포에는 S-SCAM/MAGI-2 외에도 많은 연결 단백질들이 존재하며, 이 연결 단백질들은 여러 단백질들의 활성화와 성질을 조절하고 있다.^{33,45,46} 그리고 이러한 조절은 상피세포뿐만 아니라 다양한 조직과 세포내에서도 일어나고 있다. 또한 VPAC1 단백질과 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 조절관계는 VPAC1 단백질이 발현되는 뇌, 폐, 면역세포, 심장 등에서도 중요한 의미를 가질 것이다.^{1,47} 특히 VPAC1 단백질은 여러 암세포에서 많은 발현이 관찰되어 암과의 연관성으로 주목되어 왔다.^{1,2,48,49} 그리고 S-SCAM/MAGI-2 연결 단백질은 암 억제 기능을 가진 단백질로 관심이 있어왔다.^{25,31-33} 그러므로 이러한 상반된 기능을 하는 관계로서 두 단백질 간의 상호 결합과 VPAC1 단백질의 조절은 또 다른 중요한 의미를 지니고 있다.

본 실험 결과를 통해 S-SCAM/MAGI-2 연결 단백질은 VPAC1의 세포막 발현을 감소시켜 VPAC1의 활성을 억제함을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과는 WDHA 증후군, 천식, 면역계 질병 등의 효과적인 치료법을 개발하는데 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

VIP는 장 상피세포에서 이온과 물의 이동을 촉진 시키는 신호로 중요한 역할을 한다. VIP의 수용체인 VPAC1의 활성을 조절하는 기전으로 S-SCAM /MAGI-2 연결 단백질의 역할을 살펴보았다.

1. 효모와 포유류 세포에서 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 PDZ 1과 PDZ 2 분역에 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단이 상호 결합함을 관찰하였다. 또한 VPAC1 단백질의 카르복실기 말단에서 5개 아미노산이 결손되었을 때 S-SCAM/MAGI-2 단백질과의 상호 결합이 약해짐을 관찰했다. VPAC1의 카르복실기 말단의 4개 아미노산인 VSLV 구조가 S-SCAM/MAGI-2 단백질과 결합하는데 중요함을 알 수 있었다.

2. S-SCAM/MAGI-2 단백질을 안정적으로 발현하는 HEK293 세포주에서 VPAC1의 활성에 의한 cAMP의 생성이 감소하였다. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 활성을 억제함을 알 수 있었다.

3. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 안정적으로 발현하는 HEK293 세포주에서 VPAC1 단백질의 세포막 발현이 감소함을 보았다. S-SCAM/MAGI-2 단백질이 VPAC1 단백질의 세포막 발현을 억제하고 있었다. 이로서 S-SCAM /MAGI-2 단백질에 의한 VPAC1 단백질의 활성 억제 효과 기전의 일부를 알 수 있었다.

4. T84 세포주 내에 S-SCAM/MAGI-2 단백질과 아형인 MAGI 단백질이 존재함을 anti-S-SCAM 항체를 통해 Western blot으로 확인하였다.

S-SCAM/MAGI-2 단백질 아형이 감소된 T84 세포주에서 tight junction에 의해 형성되는 저항의 생성이 약화됨을 보았다. S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현을 안정적으로 줄인 T84 세포주에서 저농도의 VIP에서도 VIP 수용체의 활성이 크게 나타남을 볼 수 있었다. S-SCAM/MAGI-2 단백질 발현할 때는 VIP농도에 따른 VIP 수용체의 반응차가 큰 것을 볼 수 있었다.

이상의 결과를 보아 VPAC1 단백질은 연결 단백질인 S-SCAM/MAGI-2 단백질에 의해 활성이 억제되고 동시에 VIP농도에 따른 반응을 조절 받게 된다는 것을 알 수 있었다. 이는 같은 농도의 결합물질에 의해서 다양한 반응이 일어나는 기전의 일부를 보여준다. VPAC1에 대한 S-SCAM/MAGI-2 단백질의 조절역할은 생체의 각 조직과 세포에 발현하고 있는 VPAC1의 활성 기전 이해에 도움을 줄 것이다. 그리고 WDHA 증후군, 천식, 면역계 질병 등의 효과적인 치료법을 개발하는데 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Laburthe M, Couvineau A, Marie JC. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors and Channels* 2002;8:137-153.
2. Rebeca B, Juan CP, Guillermo B, Jose Z, Luis F, Isabel C. VIP and PACAP receptor couple to adenylyl cyclase in human lung cancer: a study in biopsy specimens. *Peptides* 2003;24:429-436.
3. el Battari A, Luis J, Martin JM, Fantini J, Muller JM, Marvaldi J Pichon J. The vasoactive intestinal peptide receptor on intact human colonic adenocarcinoma cells (HT29-D4). *Biochem J* 1987;242:185-191.
4. Sreedharan SP, Patel DR, Huang JX, Goetzl EJ. Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:546-553.
5. Izu LT, McCulle SL, Ferreri-Jacobia MT, Devor DC, Duffey ME. Vasoactive intestinal peptide-stimulated Cl^- secretion: activation of cAMP-dependent K^+ channel. *J Membr Biol* 2002;186:145-157.
6. Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Aquaporin and colonic cells ; enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line. *J Gastroenterol Hepatol*

2003;18:203-210

7. Kim WK, Kann Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, Jonakait GM. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- α production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci* 2000;20:3622-3630

8. Henning RJ, Sawmiller DR. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res* 2001;49:27-37

9. Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ, and Muallem S. Regulation of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 Cells. *J Biol Chem* 1999;274:3414-3421.

10. Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, and Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem* 1999;274:14670-14677.

11. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 2001;410:94-1097.

12. Thiagarajah JR, Broadbent T, Hsieh E, Verkman AS. Prevention of toxin-induced intestinal ion and fluid secretion by a small-molecule CFTR inhibitor. *Gastroenterology* 2004;126:511-519.
13. Singh AK, Devor DC, Gerlach AC, Gondor M, Pilewski JM, Bridges RJ. Stimulation of Cl⁻ secretion by chlorzoxazone. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292(2):778-787
14. Kunzelmann Karl, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 2002;82:245-289
15. Ulrich II CD , Holtmann M, Miller LJ. Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology* 1998 ;114:382-97.
16. Jensen RT. Overview of chronic diarrhea caused by functional neuroendocrine neoplasms. *Semin Gastrointest Dis* 1999;10:156-72.
17. Cartwright CA, McRoberts JA, Mandel KG, Dharmasathaphorn K. Synergistic action of cyclic adenosine monophosphate and calcium-mediated chloride secretion in a colonoc epithelial cell line. *J Clin Invest* 1985;76:1837-1842
18. Toriano R, Kierbel A, Ramirez MA, Malnic G, Parisi M.

Spontaneous water secretion in T84 cells: effects of STa enterotoxin, bumetanide, VIP, forskolin, and A-23187. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G816-822.

19. Adamou JE, Aiyar N, Van Horn S, Elshourbagy NA. Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:385-392

20. Chochola J, Fabre C, Bellan C, Luis J, Bourgerie S, Abadie B, Champion S, Marvaldi J, el Battari A. Structural and functional analysis of the human vasoactive intestinal peptide receptor glycosylation. *J Biol Chem* 1993;268:2313-2318

21. el Battari A, Forget P, Fouchier F, Pic P. Effect of inhibiting N-glycosylation or oligosaccharide processing on vasoactive intestinal peptide receptor binding activity and structure. *Biochem J* 1991;278:527-533

22. McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, Robertson DN, Mackenzie CJ, Mitchell R et al. ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by VPAC receptors and a PAC1 receptor splice variant. *Mol Pharmacol* 2001;59:1523-1532.

23. Sun QQ, Prince DA, Huguenard JR. Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activate

hyperpolarization-activated cationic current and depolarize thalamocortical neurons in vitro. *J Neurosci* 2003;23:2751-2758.

24. Yao I, Hata Y, Ide N, Hirao K, Deguchi M, Takai Y et al. MAGUIN, a novel neuronal membrane-associated guanylate kinase-interacting protein. *J Biol Chem* 1999;274:11889-11896.

25. Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Banks L et al. Oncogenic human papillomavirus E6 protein target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 2002;21:5088-5096.

26. Harris BZ, Lim WA. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci* 2001;114:3219-3231.

27. Hirao K, Hata Y, Yao I, Deguchi M, Kawabe H, Takai Y et al. Three isoform of synaptic scaffolding molecule and their characterization. *J Biol Chem* 2000;275:2966-2972.

28. Nishimura W, Yao I, Iida J, Tanaka N, Hata Y. Interaction of synaptic scaffolding molecule and β -Catenin. *J Neurosci* 2002 ;22:757-765.

29. Yap CC, Muto Y, Kishida H, Hashikawa T, Yano R. PKC regulates the δ 2 glutamate receptor interaction with S-SCAM/MAGI-2 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:1122-1128.

30. Xu J, Paquet M, Lau AG, Wood JD, Ross CA, Hall RA β ₁-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). *J Biol Chem* 2001;276:41310-41317.
31. Tolkacheva T, Boddapati M, Sanfiz A, Tsuchida K, Kimmelman AC, Chan AM. Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation site at threonin 382 and 383. *Cancer Res* 2001;61:4985-4989.
32. Wu X, Hepner K, Shobha CP, Do Duc, Kaye MB, Whang YE et al. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein. MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:4233-4238.
33. Tsukita S, Furuse M, Itoh M Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:285-293.
34. Mok H, Shin H, Kim S, Lee J, Yoon J, Kim E Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1Ba with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/Discs Large/Zona Occludens-1 proteins. *J Neurosci* 2002;22:5253-5258.

35. Karaki SI, Kuwahara A Regulation of intestinal secretion involved in the interaction between neurotransmitters and prostaglandin E2. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:96-99.
36. Prince LS, Tousson A, Marchese RB Cell surface labeling of CFTR in T84 cells *Am J Physiol* 1993;264:491-498.
37. Ishii M, Kurachi Y. Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life Sci* 2003;74:163-171.
38. van Ham M, Hendriks W PDZ domains—glue and guide. *Mol Biol Rep* 2003;30:69-82.
39. Fan JS, Zhang M Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals* 2002;11:315-321.
40. Marie JC, Christiane RF, Couvineau A, Nicole P, Devaud H, Laburthe et al. Serine 447 in the carboxyl tail of human VPAC1 receptor is crucial for agonist-induced desensitization but not internalization of receptor. *Mol Pharmacol* 2003;64:1565-1574.
41. Histoshi H, Nobuya O, Nami H, Kyohei Y, Kumiko I, Akemichi B et al. Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of vasoactive intestinal polypeptide binding and

activation. *Mol Pharmacol* 1997;52:128-135.

42. Du K, Nicole P, Couvineau A, Laburthe M. Aspartate 196 in the first extracellular loop of the human VIP1 receptor is essential for VIP binding and VIP-stimulated cAMP production. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:289-292.

43. Dealmeida VI, Mayo KE. Identification of binding domains of the growth hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor proteins. *Mol Endocrinol* 1998;12:750-765.

44. Penela P, Ribas C, Mayor FJ. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 2003;15:973-981.

45. Matter K, Balda MS. Signalling to and From tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:225-236.

46. Roh AH, Margolis B. Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F377-F387.

47. Pozo D, Guerrero JM, Calvo JR. Homologous regulation of vasoactive intestinal peptide(VIP) receptors on rat peritoneal macrophages. *Peptides* 1995;16:313-318.

48. Bhargva S, Licha K, Knaute T, Ebert B, Becker A, Rudolf VE et al. A complete substitutional analysis of VIP for better tumor imaging properties. *J Mol Recognition* 2002;15:145-153.

49. Waschek JA, Richards ML, Bravo DT. Differential expression of VIP/PACAP receptor genes in breast, intestinal, and pancreatic cell lines. *Cancer Lett* 1995;92:143-149.

Abstract

Biochemical and functional interaction between VPAC1 and S-SCAM

Young Woong Kim

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Associate Professor Min Goo Lee)

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) is neurotransmitter and neuro-modulator that has a wide distribution in peripheral and central nervous systems. VIP has effects on the digestive tract, cardiovascular system, airways, reproductive system, immune system, endocrine glands and brain. The high blood concentration of VIP as seen in VIPoma, causes WDHA (watery diarrhea, hypokalemia, and achlorhydria) syndrome and hypercalcemia. The present study aimed to study the regulation of VPAC1 (vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylatecyclase - activating peptide receptor 1) by protein interaction. Using yeast two-hybrid assay, it was found that PDZ1 and PDZ2 domains of rat

S-SCAM/MAGI-2 (synaptic scaffolding molecule) interact with the C-terminus of mouse VPAC1. S-SCAM/MAGI-2 is an adaptor protein which has six PDZ domains (PDZ 0 to PDZ 5), one GK (Guanylate kinase) domain, and two WW domains. The S-SCAM-VPAC1 interaction was also verified by co-immunoprecipitation in HEK293 cells with heterologous expressions. VPAC1 is coupled to Gs proteins and the activation of VPAC1 by ligand binding increases the intracellular concentration of cAMP. Interestingly, overexpression of S-SCAM inhibited the cAMP generation in response to VIP in VPAC1-expressed HEK293 cells. When the expression of S-SCAM/MAGI-2 was decreased by anti-sense treatments in T84 cells, short circuit current that was made by VIP was increased. These results suggest that S-SCAM/MAGI-2 protein inhibited and regulated the activation of VPAC1. To identify the underlying molecular mechanism, *in vivo* surface biotinylation assay was performed. It was found that VPAC1 expression on plasma membrane was decreased by S-SCAM/MAGI-2.

In conclusion, S-SCAM/MAGI-2 adaptor protein inhibited the activation of VPAC1. Decreased activity of VPAC1 was caused by decreased VPAC1 expression on plasma membrane. Therefore, this finding might have a greater implication for providing efficient therapies for VIP related diseases.

Key Words: VPAC1, S-SCAM/MAGI-2, PDZ, cAMP